### Біохімія лікарських рослин Лабораторне заняття № 9

**Тема: Сапоніни**

**Перелік питань для самопідготовки:**

1. **САПОНІНИ.** Визначення та класифікація.
2. Фізико-хімічні властивості сапонінів.
3. Методи якісного та кількісного аналізу цих сполук в рослинній сировині.
4. Розповсюдження.
5. Біогенез.
6. Біологічна дія. Представники.
7. Рослини, які містять ці сполуки. Біологічні властивості та застосування в медицині.

### Навчальні завдання:

**ЗАВДАННЯ 1. Виконайте лабораторну роботу** (див. додаток): виділення та якісні реакції

**ЗАВДАННЯ 2.** Використовуючи матеріали лекції, основної та додаткової рекомендованої літератури, складіть ***загальну схему утворення сапонінів*** із зазначенням проміжних продуктів*.*

Остання біохімічна концепція біосинтезу свідчить, що тритерпеновий С30-попередник синтезується з’єднанням двох фарнезильних С15-залишків «хвіст до хвоста», з якого після проходження декількох проміжних стадій утворюється сквален. Сквален перетворюється на сквален-2,3-оксид, у молекулі якого атом С-3 асиметричний. Далі він циклізується. Цією реакцією фотосинтезуючі рослини, які утворюють циклоартенол, відрізняються від нефотосинтезуючих організмів (гриби, тварини), у яких продуктом метаболізму є ланостерол. Шлях від сквален-2,3-оксиду до пентациклічних тритерпенів, наприклад α-амірину, підкріплений значними експериментальними даними. (див. додаток).



### Завдання 3. Проаналізуйте методи якісного аналізу ЛРС, яка містить сапоніни та узагальніть результати у вигляді таблиці.

### Методика виділення сапонінів з ЛРС:

### Якісний аналіз ЛРС, яка містить сапоніни

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Група реакцій** | **Назва реакції** | **Реактиви** | **Результат реакції (забарвлення/осад)** |
| ***Засновані на фізичних властивостях*** |  |  |  |
| ***Засновані на хімічних властивостях:******- осадження*** |  |  |  |
| ***Засновані на хімічних властивостях:******- кольорові*** |  |  |  |
| ***Засновані на біологічних властивостях*** |  |  |  |

### ЗАВДАННЯ 4. Проаналізуйте методи якісного/кількісного аналізу ЛРС, яка містить сапоніни.

1. **Пінне число.**

***Показник сапонінності або пінне число*** – найменша концентрація настою (зведену до одиниці речовини), що утворює стійку, не зникаючу протягом 1 хв. піну. Пінне число – показник, типовий тільки при високому вмісті сапонінів у сировині. Цей метод використовують для попереднього дослідження ЛРС, бо пінність можуть викликати й супутні речовини.

У зразку лікарської рослинної сировини, яка містить сапоніни, визначте пінне число. По величині пінного числа віднесіть досліджувану сировину до однієї з трьох груп: вище 5000 – високе пінне число; 2000-5000 – середнє; менше 2000 – низьке.

*Методика.* Наважку досліджуваної сировини висушують до постійної ваги в сушильній шафі при температурі 60˚С, розтирають в порошок і просіюють крізь сито 355. З 1.0 г порошку готують 1% настій. 10 мл настою наливають в мірний циліндр з притертою пробкою, який починаючи з відмітки 10 мл повинен мати вільну довжину 7-8 см до краю циліндру. Циліндр з настоєм енергійно збовтують протягом 15 с. Визначають мінімальну концентрацію настою, який дає піну, не зникаючу протягом 1 хв.

Розрахунок: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Висновки: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

***Приклад розрахунку:*** Досліджуваний 1% р-н розчинили в 30 разів (2 мл первинного настою та 58 мл води). Загальне розведення становить 100\*30=3000. Значить, пінне число становить 3000.

1. ***Гемолітичний індекс.***

***Гемолітичний індекс (HI)*** – найменша концентрація сапонінів (настою), що викликає повний гемоліз еритроцитів (протягом 24 годин), розрахована на одиницю речовини. Визначення проводять з відмитими еритроцитами у фізіологічному розчині в пробірці.

Кількісне визначення сапонінів гемолітичним методом засновано на припущенні, що гемолітична дія прямо пропорційна кількості речовини в розчині.

***Недоліки:***

-Різні сапоніни при однаковій концентрації мають різний гемолітичний індекс (механізм гемолізу теж різний), і кожен розчин повинен мати свій стандарт - розчин чистого сапоніна.

- Позитивний результат гемолітичної проби ще не є доказом наявності сапонінів, оскільки гемоліз дають і інші рослинні речовини (наприклад, ефірні масла, кислоти, спирти).

- Сапоніни можуть перебувати в рослині в комплексі зі стеролів і не проявляти гемолітичної активності до руйнування цього комплексу.

***Методика.***

1-2 г крупного порошка ЛРС зважують на ручних аптечних вагах, поміщають в колбу Ерленмеєра, додають 0,9 г натрію хлориду, 100 мл киплячої води, зважують колбу з вмістом з точністю до 0,01 г, настоюють впродовж 15 хв. На киплячій водяній бані. Потім додають воду до вихідної маси та фільтрують.

Дослід проводять в серії із 9 пробірок.

Піпеткою вносять в 1-шу пробірку 0,9 мл досліджуваного настою, в наступну – 0,8, потім 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 мл. Після цього вміст в кожній пробірці доводять ізотонічним розчином до 1 мл. В кожну пробірку додають по 1 мл суспензії еритроцитів і змішують.

Через 24 години спостерігають, і яких пробірках відбувся гемоліз. Якщо гемоліз відбувся в наступній пробірці, то частину основного настою розбавляють ізотонічним розчином в 10 разів і готують з нього нову серію розведень. Через 24 години спостерігають, і яких пробірках відбувся гемоліз.

В пробірках з максимальним розведенням зазвичай спостерігається зовсім безколірний розчин з осадом еритроцитів на дні (гемоліз не відбувся), потім йдуть пробірки з забарвленим в червоний колір розчином, але з осадом не дні (частковий гемоліз) і нарешті, в пробірці, розчин якої забарвлено в яскраво-червоний колір без осаду на дні, відбувся повний гемоліз.

*Гемолітичний індекс визначають за формулою:*

НІ = (2\*100)/ (а\*б),

де а – вихідна концентрація розчину, %;

б – об’єм первинного розчину в пробірці, вміст якого викликає повний гемоліз, мл.

Оскільки кров різних тварин дає різні результати, використовують фактор поправки, дослідивши цю кров на стандартному розчині. В якості стандарту використовують 0,02% р-н чистого сапоніну в ізотонічному розчині. Виконують серію розведень стандартного розчину і на наступну добу розраховують фактор F.

За 1 приймають здатність до повного гемолізу при розведенні чистого сапоніну 1:25000.

Фактор F розраховують діленням 25000 на фактичну концентрацію.

***Приклад розрахунку:***

Повний гемоліз відбувся в пробірці, що містить 0,5 мл первинного настою.

НІ = (2\*100)/ (0,02\*0,5)=20000,

F=25000/20000=1,25.

Фактор визначають одночасно з НІ та результати множать на фактор.

*Примітка:* НІ деяких видів ЛРС становить для кореня женшеня менше 100, листя плюща – 1000-1500, насіння каштану – 6000 (в т.ч есцин – 9500-12500), кореня солодки – 250-300, кореня мильнянки – 2600-3900, кореня сенеги – 2500-4500.

Методи визначення сапонінів, засновані на підвищеній токсичності цих сполук для холоднокровних тварин (риб, жаб, черв'яків), не мають переваги в порівнянні з гемолітичним індексом і зберігають головний недолік - невисоку надійність, неможливість строгого віднесення досліджуваних речовин до сапоніни. Дані методи не дозволяють визначити абсолютний вміст сапонінів в сировині.

***Риб’ячий індекс*** – найменша концентрація сапонінів, що спричинює загибель 60% риб протягом 1 години.

1. **Провести кількісне визначення сапонінів у коренях солодки методом рідинної хроматографії за методикою ДФУ 1.2 С. 549-550.** Розрахуйте результат і порівняйте з даними АНД. Зробіть висновки про відповідність зразка сировини, яку аналізуємо, вимогам стандарту. Методика. Випробовуваний розчин. 1,000 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) поміщають у конічну колбу місткістю 150 мл, додають 100,0 мл розчину 8 г/л аміак у і витримують в ультразвуковій бані протягом 30 хв. Частину надосадової рідини центрифугують. 1,0 мл одержаної надосадової рідини доводять до об'єму 5,0 мл розчином 8 г/л аміаку і фільтрують крізь фільтр (0,45 мкм).

Одержаний фільтрат використовують як випробовуваний розчин. Розчин А. 0,130 г ФСЗ моноамонію гліциризату розчиняють у розчині 8 г/л аміаку і доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл. Розчин порівняння (а). 5,0 мл розчину А доводять розчином 8 г/л аміаку до об'єму 100,0 мл. Розчин порівняння (в). 10,0 мл розчину А доводять розчином 8 г/л аміаку до об'єму 100,0 мл. Розчин порівняння (с). 15,0 мл розчину А доводять розчином 8 г/л аміаку до об'єму 100,0 мл. Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

—колонка з нержавіючої сталі розміром 0,1 О м х 4 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії із розміром частинок 5 мкм;

—рухома фаза: кислота оцтова льодяна-ацетонітрил-вода (6:30:64); —швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв;

—детектування за довжини хвилі 254 нм. Хроматографують 10 мкл розчину порівняння (с). Чутливість системи регулюють таким чином, щоб висота піків становила не менше 50% шкали реєструючого пристрою.

Хроматографують по 10 мкл кожного розчину порівняння та визначають площі піків. Будують калібрувальний графік, відкладаючи концентрації розчинів порівняння (г/100 мл) на осі абсцис і відповідні площі піків на осі ординат. Хроматографують 10 мкл випробовуваного розчину. Використовуючи час утримування та площу піка із хроматограм розчинів порівняння, виявляють та інтегрують пік кислоти гліциризинової на хроматограмі випробовуваного розчину. Вміст кислоти гліциризинової, у відсотках, обчислюють за формулою: А×5/m×В×823/840,

де: А — концентрація моноамонію гліциризату у випробовуваному розчині, визначена за допомогою калібрувального графіка, у г/100 мл, В — вміст моноамонію гліциризату у ФСЗ моноамонію гліциризату, у відсотках, m— маса наважки випробуваної сировини, у грамах, 823 — молекулярна маса кислоти гліциризинової, 840 — молекулярна маса моноамонію гліциризату (без урахування кристалізаційної води).

1. ***Проведіть визначення сапонінів у коренях солодки методом тонкошарової хроматографії,*** використовуючи ТШХ пластинки із шаром силікагелю F254, згідно з ДФУ 1.2, С. 548, розділ:

***Ідентифікація С (метод 1).*** Замалюйте схему хроматограми, розрахуйте величини Rf. Методика. Випробовуваний розчин. 0,50 г здрібненої на порошок сировини (180) (2.9.12) поміщають у круглодонну колбу місткістю 50 мл, додають 16,0 мл води і 4,0 мл кислоти хлористоводневої, нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв, охолоджують і фільтрують. Фільтр і круглодонну колбу сушать при температурі 105 °С протягом 60 хв. Поміщають фільтр у круглодонну колбу, додають 20,0 мл ефіру, нагрівають на водяній бані при температурі 40 °С зі зворотнім холодильником протягом 5 хв, охолоджують і фільтрують. Одержаний фільтрат випарюють насухо, залишок розчиняють у 5,0 мл ефіру. Розчин порівняння. 5,0 мг кислоти гліциретинової і 5,0 мг тимолу розчиняють у 5,0 мл ефіру. На лінію старту хроматографічної пластинки окремо смугами наносять по 10 мкл кожного розчину. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників розчин аміаку концентрований-вода-96 % спирт-етилацетат (1:9:25:65). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать на повітрі протягом 5 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

На хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння у нижній частині має виявлятися зона поглинання, відповідна кислоті гліциретиновій. Пластинку обприскують розчином анісового альдегіду, нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом від 5 хв до 10 хв і переглядають при денному світлі. На хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині — фіолетова зона, відповідна кислоті гліциретиновій, у верхній третині — червона зона, відповідна тимолу. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: у нижній частині — фіолетова зона, відповідна зоні кислоти гліциретиновій на хроматограмі розчину порівняння, і жовта зона (ізоліквирідигенін) — у верхній третині нижче зони тимолу на хроматограмі розчину порівняння. Можуть виявлятися також інші зони.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Схема хроматограми | N плями | Величина Rf | Забарвлення плям |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

Система розчинників:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Реактив проявлення: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Висновки: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

***Методика (2-й метод).***

2,0 г подрібненої сировини вміщають в колбу на 25 мл, додають 10 мл 70% спирту та нагрівають зі зворотнім холодильником на водяній бані 15 хв. Охолоджений фільтрат упарюють в 2 рази та наносять 25-40 мкл на лінію старту пластинки, покритою шаром силікагелю, паралельно наносять розчини свідків сапонінів (есцин).

Система розчинників: хлороформ – метанол – вода (65:50:10). Коли фронт розчинника пройде 10-11 см, пластинку виймають, висушують в витяжній шафі, переглядають у видимому та УФ-світлі, обробляють 5% р-м сірчаної кислоти в етанолі та 1% спиртовим р-м ваніліну. Хроматограму витримують в сухожаровій шафі 5-10 хв. при 110 0С. Визначають забарвлення плям стандартних зразків та екстракту.

**Зробіть висновки.**

**Додаток**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Умови:** **Адсорбент – силікагель 60,** **Система розчинників:****А – хлороформ-льодяна оцтова кислота-метанол-вода (60:32:12:8)****Б – етилацетат – етанол – вода – аміак (65:25:9:1)****В і Г - етилацетат – льодяна оцтова кислота-мурашина кислота – вода (100:11:11:26)****Проявляючий реактив:** **А і Б – 0,5 мл анісового альдегіду з 10 мл оцтової кислоти, 85 мл метанолу + 5 мл сірчаної кислоти конц., оприскують, нагрівають 5-10 хв. при 1000С та досліджують у видимому світлі;****В – послідовно 1% метанольний р-н дифенілборилоксиетиламіну і 5% спирт.р-н ПЕГ-4000, УФ 365 нм****Г – 50% р-н сірчаної кислоти, видиме світло** |

**Хроматограма спиртового екстракту коренів солодки:**

**1 – екстракт коренів солодки; 2 – гліциризин (калієва сіль); 3 – гліцеритинова кислота; 4 – суміш рутину (Rf = 0,3) та гіперозиду (Rf = 0,55)**

# Лабораторна робота

**Тема: Виділення та якісний аналіз ЛРС, яка містить сапоніни**

***Мета роботи:*** проаналізувати на прикладі сапонінів спільність біогенезу, структурні розходження і функціональні особливості цих сполук; навчитись проводити виділення та якісний аналіз сапонінів з лікарської рослинної сировини; розібрати методи кількісного аналізу сапонінів у рослинній сировині.

# Приготування витягу:

## 1 спосіб.

5 г подрібненої сировини поміщають у конічну колбу на 100 мл зі зворотним холодильником. Заливають 50 мл 50%-го спирту і нагрівають на водяному нагрівнику 15 хв. Після охолодження фільтрують крізь складчастий фільтр. 20 мл фільтрату випаровують на водяному нагрівнику до 10 мл (звільнюються від спирту). Одержаний водний витяг використовують для проведення проби піноутворення і деяких осадових реакцій, а також для визначення хімічної природи сапонінів; спирто-водний витяг — для інших якісних реакцій і хроматографічного аналізу.

## 2 спосіб.

Для якісних реакцій готують водяний настій 1:10, підігріваючи здрібнену рослинну сировину на водяній бані протягом 10 хв. Настій після охолодження фільтрують і проводять з ним необхідні реакції. Для проведення реакції гемолізу еритроцитів крові з рослинної сировини готують настій на ізотонічному розчині.

# Якісні реакції:

1. **Проба піноутворення**: 1,5 мл витягу енергійно збовтують протягом 1 хв. Утворюється стійка піна.

# Реакції осадження:

* + до 1 мл водного витягу додають 3 – 4 краплини 10%-го розчину основного ацетату свинцю;
	+ до 1 мл водного витягу додають 3 – 4 краплі баритової води;
	+ до 1 мл спирто-водного витягу додають 1 мл 1%-го спиртового розчину холестерину.
	+ з реактивом Несслера. Реактив Несслера: 10 г йодиду калію розчиняють у 10 мл води і поступово доливають при постійному розмішуванні насичений розчин сулеми, поки не з’явиться незникаюча червона каламуть. Добавляють 30 г їдкого калію і, коли останній розчиниться, доливають ще 1 мл насиченого розчину сулеми. Розводять до 200 мл, дають відстоятись, а потім рідину фільтрують;
	+ з реактивом Мілона. Реактив Мілона (два варіанти виготовлення):

1) 10 г нітрату ртуті розчиняють у 8,5 мл азотної кислоти і розбавляють подвійним об’ємом води;

2) 10 г металічної ртуті розчиняють у 15 мл концентрованої азотної кислоти і розбавляють подвійним об’ємом води, а прозорий розчин зливають;

* + з солями міді (10% -ий розчин солі);
	+ з оцтовокислим або хлористим цинком (10 %-ний розчин солі);
	+ з хлорною ртуттю (сулемою) - 5% -ний розчин.

При наявності сапонінів утворюються осади або каламуть.

# Кольорові реакції.

***Реакція Лафона.*** До 2 мл спирто-водного витягу добавляють 1 краплину 10%-го розчину заліза III сульфату, 1 мл концентрованої сірчаної кислоти і обережно нагрівають; з’являється синьо-зелене забарвлення.

***Реакція Сальковського.*** До 2 мл спирто-водного витягу добавляють 1 мл хлороформу і 5–6 краплин концентрованої сірчаної кислоти; з’являється забарвлення від жовтого до червоного.

***Реакція з п’ятихлористою сурмою.*** До 1 мл спирто-водного витягу добавляють 0,5 мл насиченого розчину п’ятихлористої сурми в хлороформі; з’являється червоне забарвлення, що переходить у фіолетове.

***Реакція з сірчаною кислотою.*** При додаванні 1-2 краплин концентрованої кислоти до розчину, що містить сапонін, виникає жовте забарвлення, яке поступово переходить у червоне (до 1/2 год.), а при більш тривалому відстоюванні і слабкому підігріванні - в червоно-фіолетове,

***Реакція з ваніліном і концентрованою сірчаною кислотою.*** До 2 мл спиртового розчину ваніліну, додають 3–4 краплини концентрованої сірчаної кислоти; з’являється червоне забарвлення. При розведенні водою тритерпеноїди утворюють сині пластівці.

***Реакція з оцтовим ангідридом і сірчаною кислотою. (Реакція Лібермана- Бурхарда).*** Досліджуваний розчин змішують з оцтовим ангідридом і потім обережно доливають такий самий об’єм сірчаної кислоти. При наявності сапонінів на межі зіткнення рідин виникає червоне забарвлення, яке переходить потім у фіолетове, синє або ізумрудно-зелене.

За присутності ***йоду*** розчин сапонінів або витяжка набуває золотаво-жовтого забарвлення.

При ***бромуванні*** утворюється продукт, що забарвлює рідину в жовтувато- оранжевий колір.

**Визначення хімічної природи.** *Метод Фонтан – Кандела (Реакція піноутворення).* В одну з двох мірних пробірок наливають 5 мл 0,1 н. хлороводневої кислоти, а в другу — 5 мл 0,1 н. розчину натрію гідроксиду. В обидві пробірки додають по 3 краплини водного витягу і збовтують протягом 1 хв. При наявності в сировині *тритерпенових сапонінів* в обох пробірках утворюється піна однакового об’єму і стійкості, а коли присутні *сапоніни стероїдної групи*, то в лужному середовищі об’єм піни та її стійкість набагато більші.

1. **Реакції, засновані на біологічних властивостях.** *Гемоліз еритроцитів.* До 1 мл настою на ізотонічному розчині додають 1 мл 2 %-ої суспензії еритроцитів в ізотонічному розчині. Кров стає прозорою, яскраво-червоною (гемоліз).

**Хроматографічне виявлення.** Досліджуваний спирто-водний розчин і зразки відомих сапонінів (“свідки”) наносять на лінію старту пластинки “Силуфол”. Після висушування пластинку поміщають у камеру з системою розчинників бензол-метанол (8:2). Одержану хроматограму висушують на повітрі у витяжній шафі, а потім поміщають її на 1 – 2 хв. в ексикатор, насичений парами йоду; з’являються плями рожево-фіолетового кольору. Пластинки іноді обприскують 15%-м спиртовим розчином фосфорновольфрамової кислоти, нагрівають при 1050 С у сушильній шафі 5 хв.; сапоніни проявляються у вигляді плям рожево-фіолетового кольору.

**Визначення вмісту.** Для кількісного визначення суми сапонінів застосовують гравіметричні методи, а для визначення індивідуальних сполук використовують титриметричний, полярографічний, спектрофотометричний, калориметричний та інші фізико-хімічні методи аналізу.